รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. **ชุดโครงการวิจัย** : โครงการวิจัยและพัฒนาการเพิ่มมูลค่าผลผลิต
2. **โครงการวิจัย** : โครงการวิจัยและพัฒนาการใช้จุลินทรีย์ในการแปรรูปผลิตผลทางการเกษตรเป็นอาหาร

   กิจกรรม : จุลินทรีย์เพื่อสุขภาพและการใช้ประโยชน์

3. **ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย)** : การวิจัยและพัฒนาการผลิตสารต้านอนุมูลอิสระจากสาหร่ายกลุ่ม Chlorophyta

   ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Production of antioxidant from microalgae (Chlorophyta)

4. **คณะผู้ดำเนินงาน**

หัวหน้าการทดลอง : นายประยูร เอ็นมาก
กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร

ผู้ร่วมงาน : วิมลวรรณ วัฒนวิจิตร และ ศุภมาศ กลิ่นขจร
กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร

5. **บทคัดย่อ**

สาหร่ายขนาดเล็กสามารถเจริญเติบโตได้โดยการสังเคราะห์แสงคล้ายเช่นเดียวกับพืชทั่วไป มีโปรตีน แป้ง กรดไขมัน และแคโรทีนอยด์ ซึ่งจัดเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญเป็นองค์ประกอบอยู่ภายในเซลล์ สารสีหรือแคโรทีนอยด์ เช่น เบต้าแคโรทีน ลิวทีน แอสต้าแซนทิน หรือแคนต้าแซนทิน มีความสำคัญในอุตสาหกรรมอาหารและเวชสำอาง สามารถนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตอาหารเสริมเพื่อสุขภาพและสารต้านอนุมูลอิสระได้ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการผลิตแคโรทีนอยด์จากสาหร่ายขนาดเล็กเพื่อเป็นวัตถุดิบในการผลิตสารต้านอนุมูลอิสระ โดยทำการเก็บตัวอย่างสาหร่ายขนาดเล็กจากแหล่งน้ำธรรมชาติโดยใช้ตาข่ายแพลงก์ตอนที่มีขนาดตา 20 ไมโครเมตร แล้วนำมาคัดแยกสาหร่ายโดยใช้ไมโครปิเปตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อให้ได้เป็นสายพันธุ์บริสุทธิ์สาหร่ายไอโซเลท SK-QSGMF6 เป็นสาหร่ายที่คัดแยกได้จากแหล่งน้ำในพื้นที่ป่าชายเลน สวนสมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ฯ จ. สมุทรสงคราม ซึ่งผลจากการทำ Sequencing พบว่าเป็นสาหร่ายสายพันธุ์ *Coelastrella* sp., และพบว่ามีโคโลนีเป็นสีส้มแดงในระหว่างการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง จึงเลือกสายพันธุ์นี้มาเพาะเลี้ยงโดยใช้

สูตรอาหารมาตรฐาน 3 สูตร คือ BBM BG-11 และ Modified Chu-13 และเปรียบเทียบสภาวะการเพาะเลี้ยงโดยใช้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์และแสงแดดโดยให้อากาศอย่างต่อเนื่อง ผลการทดลองพบว่าในสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแคโรทีนอยด์คือการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร Modified Chu-13 ที่ใช้แสงแดด โดยมีอัตราการเจริญเติบโตสูงที่สุดเท่ากับ 9.00 x 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 15 วัน ได้ผลผลิตชีวมวลเท่ากับ 2.5 กรัมต่อลิตร หลังจากทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ด้วยวิธีการตกตะกอนแล้วนำชีวมวลมาศึกษาการสกัดแคโรทีนอยด์ออกจากเซลล์สาหร่ายโดยใช้ไมโครเวฟร่วมด้วย พบว่าสภาวะในการสกัดที่เหมาะสมคือใช้กำลังไฟฟ้า 50 วัตต์ และใช้เวลาสกัด 5 นาที ที่สามารถสกัดแคโรทีนอยด์ทั้งหมดได้ 2.72 มิลลิกรัมต่อกรัมของน้ำหนักแห้ง เมื่อนำไปศึกษาชนิดของแคโรทีนอยด์ พบว่ามีเบต้าแคโรทีนเป็นแคโรทีนอยด์หลักในปริมาณ 1.3 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และมีค่าเปอร์เซ็นต์การออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 10.62 มิลลิกรัมเทียบเท่า Trolox ต่อ 100 กรัมชีวมวลสาหร่าย

คำหลัก: สาหร่ายขนาดเล็ก การเพาะเลี้ยงสาหร่าย แคโรทีนอยด์ เบต้าแคโรทีน

Abstract

Microalgae are a group of autotrophic organisms, mostly are photosynthetic as plants. It's compost of a wide spectrum of carotenoids and a source of protein, lipid and bioactive compounds in their cells. Pigment or carotenoids such as beta-carotene, lutein, astaxanthin and canthaxanthin are important for food and nutraceutical industries. It can be used as raw material for food supplement and antioxidant production. This research work aims to collect microalgae from the samples of natural water basin and investigates of carotenoids production of microalgae as raw material for antioxidant production. Firstly, micro algal samples were collected from natural water basin using plankton net. Then, they were isolated by observation of their cells under microscopes.

The isolated of SK-QSGMF6 was collected from mangrove forest of Queen Sirikit Park in Samut songkhram province, Thailand. This isolate was identified as *Coelastrella* sp. by using ITS 18S rDNA sequence. However, only this strain showed an orange-red colony in its cell after culturing by agar media. Thus, this strain was selected to cultivate in BBM, BG-11 and Modified Chu 13 culture medium under indoor and outdoor cultivation with continues aeration.

The results revealed that Modified Chu 13 medium under outdoor condition was suitable for carotenoids production. The algal reached a maximum growth of 9.00 x 10^6 cell ml^{-1} with 15 days cultivation and the maximum biomass was 2.5 gL^{-1}. After harvesting by precipitation technique, the algal biomass was extracted by Microwave

Assisted Extraction (MAE) at the power of 50 Watt and 5 minutes of extraction time. Total carotenoid was 2.72 mg/g cell dry weight. The total carotenoid was characterized by using high-performance liquid chromatography (HPLC) and found that beta-carotene was the mainly carotenoids, 1.3 $mg.g^{-1}$ dried weight. In addition, the aproximate of total antioxidant activity were obtained by DPPH-method found that 10.62 milligram equivalent Trolox per 100 gram of algal biomass.

Keywords: Microalgae, β-carotene, Microwave Assisted Extraction, Outdoor cultivation

6. คำนำ

ในปัจจุบันความตื่นตัวของผู้บริโภคทั่วโลกต่อการใส่ใจดูแลสุขภาพมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้น ทำให้ทิศทางการวิจัยและพัฒนาอาหารในปัจจุบันมุ่งเป้าสู่การพัฒนานวัตกรรมอาหารเพื่อสุขภาพ โดยเฉพาะในรูปของอาหารฟังก์ชั่น (Functional food) มีแนวโน้มสูงขึ้น เช่น ผลิตภัณฑ์อาหารเสริมสุขภาพจากสารสกัดจากธรรมชาติ เช่น โอเมก้า-3 คอลลาเจน โคเอนไซม์คิวเท็น ลิวทีน เบต้าแคโรทีน หรือ แอสต้าแซนทีน เป็นต้น ซึ่งวัตถุดิบหรือสารสำคัญชนิดต่างๆ เหล่านี้ยังคงเป็นสินค้านำเข้าและมีราคาที่ค่อนข้างสูง

สาหร่ายขนาดเล็กเป็นพืชชั้นต่ำเซลล์เดียวที่มีคลอโรฟิลล์ สามารถเจริญเติบโตได้โดยการสังเคราะห์แสงเช่นเดียวกับพืชทั่วๆไป เจริญและพบตามแหล่งน้ำธรรมชาติ ทั้งแหล่งน้ำจืด, น้ำกร่อย และน้ำเค็ม ภายในเซลล์สาหร่ายมีโปรตีน คาร์โบไฮเดรต และไขมันเป็นองค์ประกอบสำคัญ ทำให้ภายในเซลล์มีคุณค่าทางโภชนาการที่สำคัญอย่างมาก เช่น มีโปรตีน เส้นใยอาหาร กรดไขมันไม่อิ่มตัว วิตามิน เกลือแร่สูง นอกจากนี้ยังพบว่าสาหร่ายบางชนิดมีพอลีแซคคาไรด์ และสารพฤกษเคมี ในกลุ่มของโพลีฟีนอล โทโคฟีรอล สารสี หรือ แคโรทีนอยด์ มีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพทั้งในด้านการกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันเพื่อป้องกันการเกิดโรคต่างๆ ตลอดจนป้องกันการเสื่อมสลายของผนังเซลล์ในร่างกายอีกด้วย ดังนั้นโครงการวิจัยนี้มุ่งหวังที่จะศึกษาศักยภาพของพืชทางเลือกใหม่คือสาหร่ายขนาดเล็กที่คัดแยกได้จากแหล่งน้ำธรรมชาติ มาศึกษาแนวทางในการพัฒนาการผลิตสารสกัดที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีมูลค่าสูง เพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในการนำไปผลิตเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพหรือเวชสำอาง ลดการนำเข้าวัตถุดิบและผลักดันให้มีการผลิตวัตถุดิบหรือสารสำคัญต่างๆ ในเชิงพาณิชย์ได้

ทบทวนวรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

สาหร่ายขนาดเล็ก (Microalgae) เป็นสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำที่มีคลอโรฟิลล์ที่มีลักลักษณะเซลล์เดียวหรือกลุ่มโคโลนี สามารถสังเคราะห์แสงเช่นเดียวกับพืชทั่วไป มีอัตราการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วโดยสามารถเจริญได้ในทุกพื้นที่ไม่ว่าจะเป็นน้ำจืด น้ำกร่อย หรือน้ำเค็ม ภายในเซลล์ของสาหร่ายมีอาหารสะสมเป็นสารประกอบในรูปแบบต่างๆ มากมาย ได้แก่ โปรตีน คาร์โบไฮเดรตซึ่งจะอยู่ในรูปของโพลีแซคคาร์ไรด์ แป้ง ไขมันหรือน้ำมัน ในรูปของไตรกลีเซอไรด์ รวมทั้งสารสีหรือรงควัตถุเป็นองค์ประกอบ เช่น คลอโรฟิลด์ แคโรทีนอยด์ และ ไฟโคบิลิน เป็นต้น

แคโรทีนอยด์ (Carotenoid) เป็นรงควัตถุที่ร่างกายมนุษย์ไม่สามารถสร้างเองได้ จะได้รับสารชนิดนี้จากอาหารที่รับประทานเข้าไปเท่านั้น แคโรทีนอยด์มีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิระ เช่น ยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ลดอัตราการเกิดเซลล์มะเร็ง เพิ่มระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ช่วยลดความเสี่ยงในการเกิดโรคเรื้อรัง ต่าง ๆ เช่น โรคมะเร็งและโรคหัวใจได้ แคโรทีนอยด์แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มแคโรทีน (carotene) เป็นโมเลกุลที่ประกอบด้วยสายไฮโดรคาร์บอน ทำให้เป็นสารไม่มีขั้วและละลายได้ในไขมัน ได้แก่ เบตาแคโรทีน และ ไลโคพีน เป็นต้น และ กลุ่มแซนโทฟิล (xanthophyll) มีอะตอมของออกซิเจนอยู่ในโมเลกุล จึงมีขั้วมากกว่า และละลายในไขมันได้น้อยกว่าแคโรทีนอยด์กลุ่มแรก ได้แก่ ลูทีน ซีแซนทิน และ แอสตาแซนทิน เป็นต้น จากคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้เป็นอย่างดีของรงควัตถุเหล่านี้ทำให้มีสามารถนำสาหร่ายขนาดเล็กมาประยุกต์ใช้ในวงการอุตสาหกรรมอาหารเพื่อการผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ชีวภาพที่มีมูลค่าสูงเพื่อใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพและเภสัชภัณฑ์

ปัจจุบันเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กได้รับความสนใจจากนักวิจัยทั้งในและต่างประเทศเป็นอย่างมาก การเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กเพื่อให้มีการผลิตสารสำคัญ สารสี แคโรทีนอยด์ กรดไขมัน พอลีแซคคาร์ไรด์ หรือพอลิเมอร์ชีวภาพ ในปริมาณที่สูงๆนั้น จะต้องทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะชักนำ (Stress condition) ซึ่งเป็นสภาวะที่ทำให้สาหร่ายเกิดการปรับตัวเพื่อทำให้สามารถดำรงชีวิตได้ภายใต้สภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมนั้นๆ โดยมีการสะสมสารสำคัญบางชนิดไว้ในเซลล์เพิ่มขึ้น ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการชักนำ ได้แก่ อุณหภูมิ ระยะเวลาการให้แสง ความเข้มของแสง ความเป็นกรดด่างของสารอาหาร ปริมาณไนโตรเจนในสารอาหาร ตลอดจนระดับความเค็มในอาหารที่ใช้ทำการเพาะเลี้ยง เป็นต้น นอกจากนั้นจะต้องมีการศึกษาวิจัยและพัฒนาการออกแบบสิ่งก่อสร้าง เครื่องมือและอุปกรณ์ที่จะใช้ในกระบวนการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็ก เช่น การเตรียมหัวเชื้อการเพาะเลี้ยง และวิธีการเก็บเกี่ยวที่เหมาะสมกับสายพันธุ์ของสาหร่ายขนาดเล็กที่คัดเลือก เพื่อให้ได้หลักการที่ถูกต้อง สามารถลดต้นทุนการผลิตได้ มีเทคโนโลยีในการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมในแต่ละสภาพพื้นที่และสิ่งแวดล้อมนั้นๆ มีเป็นเทคโนโลยีที่ง่ายและเหมาะสมกับเกษตรกรไทย ตลอดจนต้องมีการพัฒนาสายพันธุ์สาหร่ายให้มีศักยภาพในการเจริญเติบโตที่ดี รวดเร็ว และมีการสะสมสารชนิดต่างๆที่ต้องการในระดับที่สูงขึ้นด้วย

เทคโนโลยีการผลิตเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพและเภสัชภัณฑ์จากสาหร่ายขนาดเล็ก

จากโครงสร้างภายในเซลล์ของสาหร่ายที่ประกอบไปด้วยโปรตีน มีอาหารสะสมเป็นสารประกอบพวกคาร์โบไฮเดรตในรูปของโพลีแซคคาร์ไรด์ หรือแป้ง (starch) ไขมันในรูปของ Triacylglycerides (TAGs) นอกจากนั้นยังมีรงควัตถุ (pigment) ชนิดต่างๆ ดังที่ได้กล่าวไปแล้วนั้น ทำให้มีการนำสาหร่ายขนาดเล็กมาประยุกต์ใช้ในวงการอุตสาหกรรมอาหารเพื่อการผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ชีวภาพที่มีมูลค่าสูงเพื่อใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพและเภสัชภัณฑ์ในเชิงพาณิชย์อย่างแพร่หลายในทางการค้า เช่น การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus pluvialis* เพื่อผลิตแอสตาแซนทิน การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Dunaliella* เพื่อผลิตเบต้า-แคโรทีน หรือสามารถผลิตเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่มีโปรตีน กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน ตลอดจนการนำมาสกัดน้ำมันออกจากเซลล์สาหร่ายเพื่อผลิตเป็นพลังงานชีวภาพ (Rosenberg et al., 2008)

สารสีหรือรงควัตถุ (pigment)

พืชและสาหร่ายสีเขียวทุกชนิดมีคลอโรฟิลล์ เอ และคลอโรฟิลล์ บี เป็นองค์ประกอบ โดยพบว่า รงควัตถุ (pigments) ที่มีอยู่ทั้งในพืช สาหร่าย และแบคทีเรียที่สังเคราะห์ด้วยแสงได้คือแคโรทีนอยด์ (Carotenoid) ในขณะที่สาหร่ายบางชนิดเช่นสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินหรือไซยาโนแบคทีเรียจะมีไฟโคบิลิน เป็นองค์ประกอบ ทำให้สามารถตอบแสดงต่อความยาวคลื่นของแสงที่แตกต่างกัน

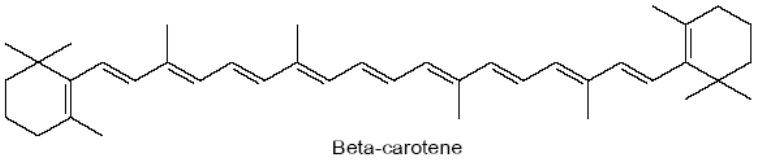
แคโรทีนอยด (Carotenoid)

เป็นรงควัตถุที่พบในคลอโรพลาสตและโครโมพลาสตของใบไม้ ดอกไม้ และผลไมของพืช นอกจากนั้นยังพบไดในเซลล์จุลชีพที่สามารถสังเคราะหแสงได เช่น สาหรายขนาดเล็ก เป็นต้น ร่างกายมนุษยไมสามารถสรางแคโรทีนอยดได้แต่จะได้รับสารชนิดนี้จากอาหารที่รับประทานเข้าไป แคโรทีนอยด์มีฤทธิ์ เปนสารตานอนุมูลอิระ เช่น ยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของ LDL สามารถลดอัตราการเกิดเซลล์มะเร็ง เพิ่มระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ชวยลดความเสี่ยงในการเกิดโรคเรื้อรังตาง ๆ เชน โรคมะเร็ง หรือโรคหัวใจ แคโรทีนอยด์แบ่งออกเปน 2 กลุม คือ

- **กลุมแคโรทีน (carotene)** เปนโมเลกุลที่ประกอบดวยสายไฮโดรคารบอน ทำใหเปนสารไมมีขั้วและละลายไดในไขมัน ไดแก เบตาแคโรทีน และ ไลโคพีน เปนตน
- **กลุมแซนโทฟล (xanthophyll)** มีอะตอมของออกซิเจนอยูในโมเลกุล จึงมีขั้วมากกวาและละลายในไขมันไดนอยกวาแคโรทีนอยดกลุมแรก ไดแก ลูทีน ซีแซนทิน และแอสตาแซนทิน เป็นต้น

เบตาแคโรทีน (β-carotene)

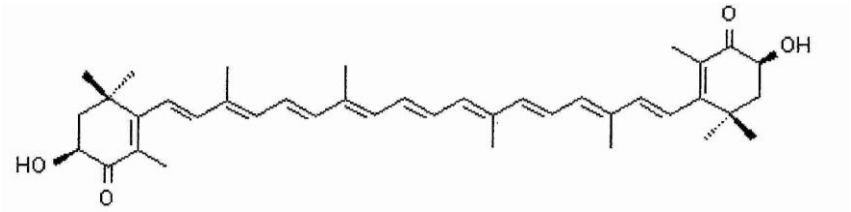
เบตาแคโรทีน หรือ สารตั้งต้นของวิตามินเอ (โปรวิตาในเอ) พบมากในพืชที่มีสีเหลืองและ สีสม เชน หัวแครอท หัวผักกาดแดง มะเขือเทศ เปนตน มีฤทธิ์เปนสารตานออกซิเดชันโดยยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของ LDL, สามารถลดอัตราการเกิดโรคมะเร็ง รักษาสุขภาพและเพิ่มระบบภูมิคุ้มกันให้แข็งแรง



รูปที่ 1 โครงสร้างของเบต้าแคโรทีน (β -carotene)

แอสตาแซนธิน (Astaxanthin)

เป็นสารสีแดงในกลุ่มแซนโทรฟิลล์ / ตระกูลแคโรทีนอยด์ พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ เช่น เนื้อ ไข่ ปลาแซลมอน ปู เปลือกกุ้ง ไข่ปลาคาเวียร์ และ สาหร่ายขนาดเล็ก เช่น สาหร่าย *Haematococcus sp.* มีโครงสร้างทางเคมีรูปแบบจำเพาะเหมือนกับสารแคโรทีนอยด์ โดยสามารถปรับตัวอยู่ในชั้นผนังเซลล์ได้ทั้งชั้นน้ำและชั้นไขมัน ดังแสดงในรูปที่ 2 ร่างกายไม่สามารถสร้างสารแอสตาแซนธินได้ แต่จะได้รับสารชนิดนี้จากอาหารที่รับประทานเข้าไป



รูปที่ 2 โครงสร้างของแอสตาแซนธิน (Astaxanthin)

ปริมาณแอสตาแซนธินที่พบในธรรมชาติจะมีปริมาณที่แตกต่างกันไป ส่วนใหญ่จะพบในปริมาณที่น้อยมาก เช่น ปลาแซลมอน 200 กรัม จะมีแอสตาแซนธิน เพียง 1 มิลลิกรัม แต่มีรายงานว่าสาหร่าย *Haematococcus Pluvialis* มีสารแอสตาแซนธินอยู่เป็นจำนวนมาก มีการนำมาสกัดเป็นอาหารเสริมและได้รับความนิยมเป็นอย่างมากในพื้นที่แถบสแกนดิเนเวีย ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1995 และมีการวางจำหน่ายอย่างแพร่หลายในตลาดตั้งแต่ปี ค.ศ. 1999 จนถึงปัจจุบัน (Guerin et al., 2003) จากความสามารถที่เหนือกว่าในด้านการปรับตัวอยู่ในชั้นผนังเซลล์ได้ทั้งชั้นน้ำและชั้นไขมัน ทำให้สามารถต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุดเมื่อเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระที่พบในสารอาหารอื่นๆ เช่น มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้สูงกว่า วิตามิน ซี 6,000 เท่า, CoQ10 800 เท่า, วิตามินอี 550 เท่า (Miki, 1991)

Shan Qin และคณะ, 2008 ศึกษาการชักนำสาหร่ายให้เกิดการสะสมสาร astaxanthin โดยการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสายพันธุ์ *Scenedesmus obliquus* ที่สภาวะแตกต่างกัน พบว่าสายหร่ายมีการสะสมสาร astaxanthin เพิ่มสูงถึง 44.66เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพาะเลี้ยงใน 2 สภาวะ โดยช่วงแรกเพาะเลี้ยงที่ 25 องศาเซลเซียส และให้อากาศในอัตรา 0.6 L min^{-1}, มีความเข้มแสง 80 mmol m^{-2} s^{-1} และเพิ่มความเข้มแสงเป็น 180 mmol m^{-2} s^{-1} อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เมื่อเพาะเลี้ยงจนมีปริมาณเซลล์ประมาณ 1.7×10^7 mL^{-1} เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อการเปรียบเทียบการใช้ Carotenoid ชนิดต่างๆ ในการกำจัดอนุมูลอิสระ พบว่าแอสตาแซนธิน มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการยับยั้งปฏิกิริยา Lipid peroxidation พบว่าใช้ปริมาณน้อยที่สุด

จากข้อมูลดังกล่าวจะเห็นว่าสาหร่ายขนาดเล็กจะมีองค์ประกอบของแคโรทีนอยด์ที่แตกต่างกันโดยรงควัตถุหลักที่พบในสาหร่ายมี 3 ชนิด คือ คลอโรฟิลล์เป็นรงควัตถุสีเขียว แคโรทีนอยด์เป็นรงควัตถุที่มี สีเหลือง และไฟโคบิลลินเป็นรงควัตถุสีน้ำเงิน ปัจจุบันมีการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่ายมากขึ้น โดยเฉพาะรงควัตถุจากสาหร่ายหลายชนิดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง สามารถนำไปใช้ในวงการอุตสาหกรรมด้านอาหาร เครื่องสำอาง และเวชภัณฑ์ต่างๆ ได้

สารสี (Pigment)

สีเป็นคุณลักษณะแรกที่ผู้บริโภคได้รับทางประสาทสัมผัสและเป็นปัจจัยที่ดึงดูดให้ผู้บริโภคตัดสินใจเลือกและยอมรับอาหารชนิดนั้นๆ ดังนั้นอาหารหลายชนิดจึงมีการปรุงแต่งสีลงไปซึ่งสีที่ใช้มักเป็นสีสังเคราะห์ ในแต่ละปีประเทศไทยนำเข้าสีผสมอาหารจากต่างประเทศเป็นจำนวนมากซึ่งมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นทุกปีตั้งแต่ปี 2554 โดยเฉพาะอย่างยิ่งในปี 2556 มีมูลค่าการนำเข้าสีสังเคราะห์สูงถึง 9,717.40 ล้านบาท ในปัจจุบันสีผสมอาหารที่นิยมใช้ได้แก่

- **สีสังเคราะห์** เป็นสีที่สังเคราะห์ขึ้นจากสารเคมี ซึ่งค่อนข้างคงตัว เช่น แอโซรูบีน เออริทโทรซิน และทาร์ทราซิน
- **สีอนินทรีย์** เช่น ผงถ่านที่ได้จากการเผาพืช และสีธรรมชาติ เป็นสีที่สกัดได้จากพืชหรือสัตว์ที่บริโภคได้ เช่น แอนโธไซยานิน แคโรทีนอยด์ และคลอโรฟิลล์ เป็นต้น

7. วิธีดำเนินการ

วัสดุและอุปกรณ์

7.1 อุปกรณ์เก็บตัวอย่างสาหร่ายขนาดเล็ก ได้แก่ ตาข่ายแพลงก์ตอน ขนาดตาข่าย 45 ไมโครเมตร, เครื่องวัดอุณหภูมิ เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่างของน้ำ, แถบวัดค่าการส่องผ่านของแสง กล้องจุลทรรศน์, ปิเปต

7.2 อุปกรณ์เพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็ก ได้แก่ หลอดไฟฟลูออเรสเซนส์, , เครื่องชั่งละเอียด, เครื่องวัดความเข้มของแสง, ปั๊มอากาศ, เครื่องวัดจำนวนเซลล์ เครื่องเขย่าและให้แสง, หม้อนึ่งฆ่าเชื้ออัดความดัน

7.3 อุปกรณ์เก็บเกี่ยวและสกัดสาร ได้แก่ ผ้ากรอง 20 ไมครอน, เครื่องปั่นผสม, อ่างควบคุมอุณหภูมิ, ตู้อบ, เครื่องปั่นความเร็วสูง, ไมโครเวฟ, เครื่องกวนสารแบบให้ความร้อน, หลอดทดลองและเครื่องแก้ว

7.4 อุปกรณ์วิเคราะห์ปริมาณสารสกัดจากสาหร่าย ได้แก่ เตาเผา เครื่องวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน TLC, HPLC, เครื่องวิเคราะห์ปริมาณไฟเบอร์ เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์

สารเคมี

7.5 สารเคมีสำหรับเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็ก ได้แก่ KNO_3, $MnCl_2$, Citric acid, K_2HPO_4,

$ZnSO_4$, H_3BO_3, $MgSO_4$, $CuSO_4$, KOH, $CaCl_2$, $CoCl_2$, HCl Na_2MoO_4, Fe citrate เป็นต้น

7.6 สารเคมีสำหรับการเก็บรักษาเซลล์สาหร่ายขนาดเล็ก ได้แก่ Dimethyl sulfoxide (DMSO)

7.7 สารเคมีสำหรับสกัดแคโรทีนอยด์ ได้แก่ เมทานอล, กรดซัลฟูริก, เฮกเซน เอทานอล เป็นต้น

7.8 สารเคมีวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์ ได้แก่ อะซิโตไนไตร เตตระฟูแรน เฮปเทน เมทานอล

วิธีการ

1. การเก็บตัวอย่างและคัดแยกสาหร่ายขนาดเล็กจากแหล่งน้ำธรรมชาติ

การคัดแยกสาหร่ายขนาดเล็กจากแหล่งน้ำธรรมชาติเพื่อนำมาใช้ศึกษาในครั้งนี้ประกอบด้วย 5 ขั้นตอน ดังรายละเอียดต่อไปนี้

1.1 การเก็บตัวอย่างน้ำจากแหล่งน้ำธรรมชาติ

ทำการเก็บตัวอย่างสาหร่ายที่เจริญและลอยอยู่ในน้ำโดยใช้ตาข่ายแพลงก์ตอน (Plankton net) ขนาดตา 45 ไมโครเมตร ที่ก้นตาข่ายจะมีขวดแก้วติดอยู่เพื่อเป็นที่เก็บตัวอย่างน้ำที่กรองได้ วิธีการใช้งานตาข่ายแพลงก์ตอน ให้ใช้มือที่ไม่ถนัดจับที่ปลายเชือก ซึ่งเชือกควรจะยาวเท่ากับระยะห่างที่ต้องการจะเก็บตัวอย่างน้ำ ส่วนมือที่ถนัดจับตาข่ายแพลงก์ตอนแล้วโยนไปในบริเวณที่ต้องการ ค่อยๆดึงเชือกเข้าหาตัวผู้ใช้งาน เก็บตัวอย่างลงในภาชนะที่เตรียมไว้ ถ้าพื้นที่ๆทำการเก็บตัวอย่างมีพื้นที่กว้างมาก อาจจะใช้วิธีนั่งเรือแล้วลากถุงตาข่ายแพลงก์ตอน สุ่มเก็บตัวอย่างน้ำไปเรื่อยๆ จนทั่วบริเวณพื้นที่นั้นๆ

1.2 การเพิ่มจำนวนเซลล์สาหร่ายขนาดเล็ก

นำตัวอย่างน้ำที่เก็บจากแหล่งน้ำธรรมชาติมาเพาะเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่มีอาหารสูตร Modified Chu 13 ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ เรียบร้อยแล้ว และให้อากาศที่ผ่านการกรองจากปั๊มอากาศเป็นเวลา 30 วัน สำหรับอาหารสูตร Modified Chu 13 เป็นสูตรอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก

1.3 การคัดแยกสาหร่ายขนาดเล็ก

คัดแยกเซลล์สาหร่ายขนาดเล็กจากแหล่งน้ำธรรมชาติเพื่อให้ได้สาหร่ายเซลล์เดียวสายพันธุ์ที่มีความบริสุทธิ์ โดยใช้วิธีดูดออกโดยใช้ไมโครปิเปตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (ยุวดี พีรพรพิศาล, 2546) ซึ่งมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1) เจือจางปริมาณเซลล์สาหร่ายด้วยอาหารสูตร Modified Chu 13 ที่หยดบนแผ่นกระจกสไลด์ 3-5 ครั้ง
2) นำแผ่นสไลด์หลุมที่มีสาหร่ายมาหาเซลล์สาหร่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า ซึ่งจะเลือกคัดแยกเฉพาะสาหร่ายที่พบเป็นจำนวนมากในแต่ละแหล่งน้ำนั้นๆ

3) จุ่มไมโครปิเปตที่ดึงสาหร่ายจากข้อ 2 ลงในอาหารเหลวบนแผ่นสไลด์แผ่นใหม่โดยใช้จุกยางสวมที่ปลายไมโครปิเปต บีบอาหารเหลวที่มีสาหร่ายออก ตรวจดูสาหร่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์ตามข้อ 2 จนได้สาหร่ายเพียง 1 เซลล์ ถ่ายลงในอาหารเหลวและเพาะเลี้ยงต่อไป

1.4 การระบุชนิดของสายพันธุ์สาหร่ายขนาดเล็ก

นำโคโลนีของสาหร่าย 1 โคโลนี มาเพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ (flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลวปริมาตร 150 มิลลิลิตร ในสภาวะแบบให้แสง บนเครื่องเขย่าที่มีความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที ต่อเนื่องเป็นเวลา 15 วัน จากนั้นถ่ายเซลล์ลงในอาหารเหลวปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร เพื่อเพาะเลี้ยงต่อจนสาหร่ายมีการเจริญเข้าสู่ระยะเอ็กซ์โพเนนเชียลแล้วนำเซลล์ที่ได้ไประบุชนิดของสายพันธุ์ซึ่งมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1) นำเซลล์สาหร่ายมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส แล้วบดให้เซลล์แตกในโกร่งที่ปลอดเชื้อ แล้วสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (DNA extraction kit) ตามวิธีการของผู้ผลิต (QIAGEN, Valencia, USA)
2) เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของสาหร่ายขนาดเล็กด้วยเทคนิคการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส แล้วนำดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้มาแยกชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกันออกจากกันด้วย Agarose gel electrophoresis เพื่อนำมาตรวจสอบขนาดและคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยเครื่องถ่ายภาพและวิเคราะห์สารพันธุกรรม
3) ตัดแถบดีเอ็นเอที่ต้องการมาสกัดแยกให้บริสุทธิ์ด้วยชุด DNA Extraction Kit โดยทำตามวิธีการของผู้ผลิต (Fermentas, Maryland, USA) เพื่อนำไปทำการวิเคราะห์ลำดับเบสของดีเอ็นเอ 18S rDNA แล้วนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank ของ NCBI โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป (NCBI BLAST program)

1.5 การเก็บรักษาสายพันธุ์สาหร่ายขนาดเล็ก

นำสาหร่ายบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้ประมาณ 3 มิลลิลิตร ใส่ไว้ในหลอด Cryo tube ในสภาพปลอดเชื้อภายในหลอดมีสารละลาย 20% Dimethyl sulfoxide (DMSO) ประมาณ 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปเก็บไว้ในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส

2. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตและการสะสมแคโรทีนอยด์ไว้ในเซลล์สาหร่ายขนาดเล็ก

2.1 การเตรียมหัวเชื้อสาหร่ายตั้งต้น (Starter culture)

นำสาหร่ายขนาดเล็กที่คัดเลือกได้มาเพาะเลี้ยงในระดับห้องปฏิบัติการโดยเพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลวปริมาตร 150 มิลลิลิตร ในสภาวะที่ให้แสงบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที วัดการเจริญเติบโตสาหร่ายขนาดเล็กด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร เมื่อมีค่าความขุ่นเท่ากับ 0.3 จึงนำไปใช้ศึกษาในขั้นตอนต่อไป

2.2 **การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเจริญเติบโต**

ทำการคัดเลือกสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายขนาดเล็ก โดยนำตัวอย่างสาหร่ายจากข้อ 2.1 มาศึกษาอัตราการเจริญเติบโตโดยวางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 6 ซ้ำ 3 กรรมวิธี คือ อาหารสูตร BBM, อาหารสูตร BG-11 และ อาหารสูตร Modified Chu-13 ทำการเพาะเลี้ยงสภาวะแบบออโตโทรฟิค ที่มีอัตราการให้แสงต่อไม่ให้แสง 16 ต่อ 8 ชั่วโมง ที่มีความเข้มแสงขนาดประมาณ 2,500 ลักซ์ อุณหภูมิห้องเฉลี่ยประมาณ 28-29 องศาเซลเซียสโดยทุกกรรมวิธีจะเก็บตัวอย่างเพื่อติดตามการเจริญเติบโตต่อเนื่องเป็นเวลา 30 วัน แล้วเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตของสาหร่ายในแต่ละกรรมวิธี

2.3 การศึกษาอิทธิพลในการสะสมแคโรทีนอยด์ไว้ในเซลล์สาหร่ายขนาดเล็ก

เลือกสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายขนาดเล็กจากการทดลองในข้อ 2.2 มาใช้ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายเพื่อศึกษาอิทธิพลในการสะสมแคโรทีนอยด์ไว้ภายในเซลล์ โดยการเปรียบเทียบชนิดของแหล่งให้แสง มี 2 ชนิด ได้แก่ หลอดฟลูออเรสเซนต์ และ แสงแดด เก็บข้อมูลอัตราการเจริญเติบโตเป็นระยะเวลา 30 วัน และนำชีวมวลของสาหร่ายขนาดเล็กที่เพาะเลี้ยงได้มาวิเคราะห์องค์ประกอบและปริมาณแคโรทีนอยด์

2.4 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กในระดับขยายขนาด

นำสาหร่ายขนาดเล็กมาศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยงในระดับขยายขนาดในภาชนะขนาด 500 ลิตร โดยใช้สภาวะที่ได้จากการทดลองใน ข้อ 2.2-2.3 ภายใต้สภาวะออโตโทรฟิค โดยใช้แสงจากธรรมชาติ ไม่มีการควบคุมอุณหภูมิ

2.4.1 การติดตามการเจริญเติบโตของสาหร่ายขนาดเล็ก มีวิธีการดังต่อนี้

1) **วิธีการนับจำนวนเซลล์ของสาหร่ายขนาดเล็ก** ในการทดลองในครั้งนี้ใช้วิธีการนับจำนวนเซลล์ของสาหร่ายขนาดเล็กโดยใช้ Heamacytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่มีกำลังขยาย 400 เท่า แล้วคำนวณจำนวนเซลล์ของสาหร่าย (ยุวดี พีรพรพิศาล, 2546)
2) **วิธีการวัดค่าความขุ่นของเซลล์สาหร่ายขนาดเล็ก** ทำการวัดค่าความขุ่นของสาหร่ายขนาดเล็กด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่มีความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร
3) **วิธีการวัดน้ำหนักของเซลล์แห้ง** เก็บตัวอย่างเซลล์ปริมาตร 5 มิลลิลิตร มาปั่นเหลี่ยงให้ตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่มีความเร็วรอบ 3500 รอบต่อนาที ล้างตะกอนเซลล์ให้สะอาดด้วยน้ำกลั่นแล้วนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส จนได้น้ำหนักที่คงที่ นำค่าที่ได้ทั้ง 3 วิธีไปคำนวณหาค่าน้ำหนักเซลล์แห้งในหน่วยกรัมต่อลิตร

2.4.2 การศึกษาวิธีการเก็บเกี่ยวเซลล์

เมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายให้เจริญเข้าสู่ระยะคงที่ แล้วนำมาศึกษาวิธีการเก็บเกี่ยวเซลล์สาหร่ายโดยใช้วิธีการตกตะกอน (Settling), การกรอง (Filtration) และ ปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)

2.4.3 การวิเคราะห์องค์ประกอบภายในเซลล์สาหร่ายขนาดเล็ก มีวิธีการวิเคราะห์ดังนี้

1) การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน โดยใช้วิธี Total Kjeldahl Nitrogen (TKN)
2) การวิเคราะห์ปริมาณน้ำมัน โดยใช้วิธีการสกัดทางเคมีด้วยเครื่องซอกเล็ต
3) การวิเคราะห์ปริมาณเถ้า โดยใช้วิธีของวีนเดอร์
4) การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น โดยใช้วิธีของวีนเดอร์

2.5 การศึกษาวิธีการสกัดแคโรทีนอยด์ออกจากเซลล์สาหร่ายขนาดเล็ก

ศึกษาวิธีการสกัดแคโรทีนอยด์โดยเปรียบเทียบระหว่างวิธีซอกเล็ท (Soxhlet extraction) และ การใช้คลื่นไมโครเวฟ (Microwave Assisted Extraction) ซึ่งทำการออกแบบการทดลอง โดยการศึกษาผลของระยะเวลาที่ใช้ในการสกัด (5, 10, 15, 20 นาที) และ กำลังไฟฟ้า (30 - 750 วัตต์) มีวิธีการทดลองดังนี้

1) นำชีวมวลสาหร่ายจากข้อ 3.3-3.4 ที่เพาะเลี้ยงให้เจริญเข้าสู่ระยะ Late log phase มาทำให้เซลล์แตกด้วย Dimethyl Sulfoxide (DMSO)
2) นำไปสกัดด้วยวิธีซอกเล็ท และ การใช้คลื่นไมโครเวฟ ที่มีระยะเวลาสกัด 5, 10, 15 และ 20 นาที และแปรผันกำลังไฟฟ้า 30 - 750 วัตต์ โดยใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายอินทรีย์
3) ปั่นแยกตะกอนเซลล์ออกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ที่มีความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที 5 นาที
4) นำสารละลายที่ไปมาปรับปริมาตรให้ได้ 25 มิลลิลิตร ด้วยสารละลายอะซีโตน
5) วิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมด ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร (Sommer, 1992)
6) การตรวจสอบองค์ประกอบเบื้องต้นของแคโรทีนอยด์ นำสารสกัดมาทำการตรวจสอบองค์ประกอบเบื้องต้นของแคโรทีนอยด์ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบแผ่นบาง (Thin Layer Chromatography: TLC) ที่อิ่มตัวด้วยไอของสารละลายผสมของ เฮกเซน/เอทิลอะซีเทต/เอทานอล ในอัตราส่วน 50/49/1 (Donkin, 1976) และคำนวณค่า R value หรือค่า Rf เปรียบเทียบกับสารแคโรทีนอยด์มาตรฐาน
7) วิเคราะห์ชนิดของแคโรทีนอยด์ที่สกัดได้โดยใช้วิธีโครมาโตกราฟีแบบ High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

8) วิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชัน (Antioxidant) ของสารสกัดแคโรทีนอยด์จากสาหร่ายขนาดเล็กโดยวิธี DPPH assay

เวลาและสถานที่ : 1 ตุลาคม 2553 – 30 กันยายน 2557

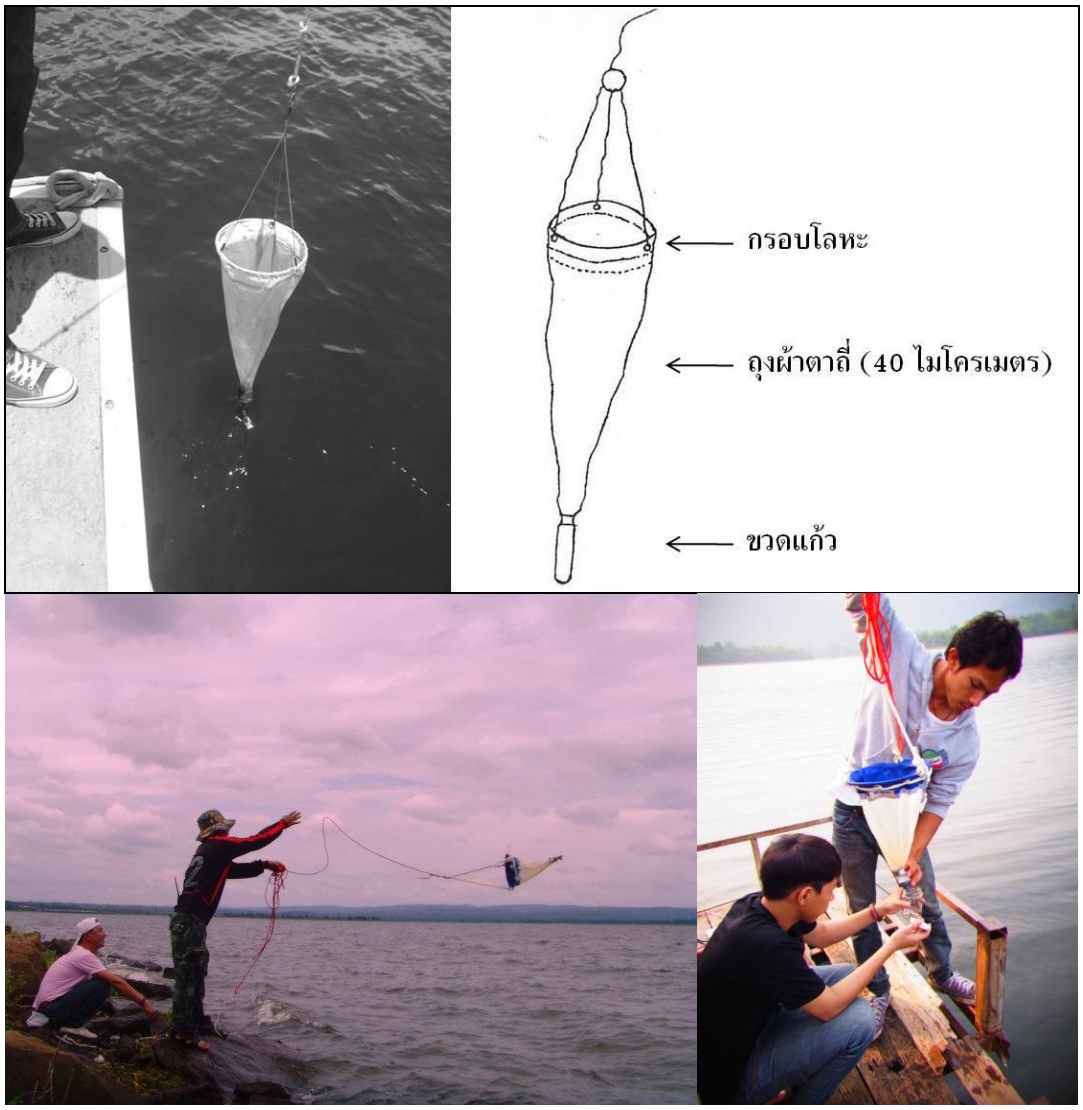
: กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร

8 ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การเก็บตัวอย่างและคัดแยกสาหร่ายขนาดเล็ก

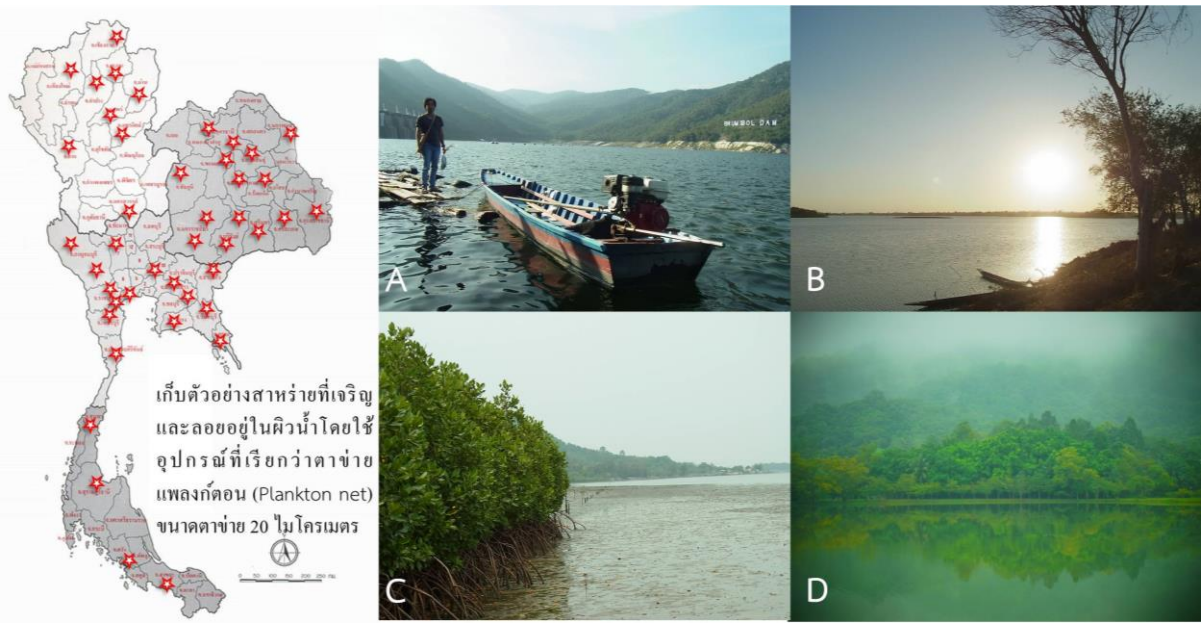
1.1 การเก็บตัวอย่างน้ำเพื่อนำมาคัดแยกสาหร่าย

วิธีการเก็บตัวอย่างสาหร่ายขนาดเล็กขึ้นอยู่กับขนาด รูปร่าง และแหล่งที่อยู่อาศัยของสาหร่าย ซึ่งการเก็บในครั้งนี้ได้ทำการเก็บตัวอย่างสาหร่ายที่เจริญและลอยอยู่ในผิวน้ำโดยใช้อุปกรณ์ที่เรียกว่าตาข่ายแพลงก์ตอน (Plankton net) ขนาดตาข่าย 20 ไมโครเมตร ที่ปลายตาข่ายจะมีขวดแก้วขนาดเล็กติดอยู่เพื่อเป็นที่เก็บตัวอย่างน้ำที่กรองได้ ซึ่งมีลักษณะดังรูปที่ 1.1



รูปที่ 1.1 รายละเอียดของตาข่ายแพลงก์ตอนและลักษณะของการใช้งาน

การเก็บตัวอย่างสาหร่ายสำหรับงานวิจัยในครั้งนี้ จะเลือกเก็บจากบริเวณที่เป็นพื้นที่ชุ่มน้ำ มีน้ำขังตลอดปี และแหล่งเก็บน้ำขนาดใหญ่ครอบคลุมพื้นที่ที่เป็นน้ำจืด น้ำกร่อย และน้ำเค็ม ของประเทศไทย โดยยังไม่ครอบคลุมพื้นที่ในจังหวัดชายแดนภาคใต้ ตัวอย่างสภาพแหล่งน้ำที่ได้ไปสุ่มเก็บตัวอย่างน้ำในครั้งนี้ แสดงไว้ในรูปที่ 1.2



รูปที่ 1.2 ตัวอย่างสภาพแหล่งน้ำที่เก็บตัวอย่างน้ำ A: เขื่อนภูมิพล จ. ตาก B: แก่งเลิงจาน จ.มหาสารคาม C: ป่าชายเลน สวนสมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ฯ จ. สมุทรสงคราม D: อ่างเก็บน้ำ ม. สงขลานครินทร์, จ. สงขลา

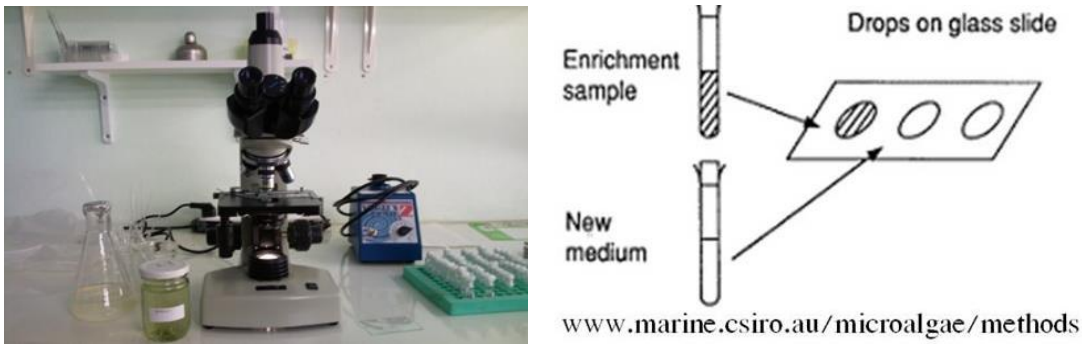
1.2 การเพิ่มจำนวนเซลล์สาหร่ายขนาดเล็ก

ตัวอย่างน้ำที่เก็บจากแหล่งน้ำธรรมชาติจะถูกนำมาเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์สาหร่ายในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่มีอาหารสูตร Modified Chu 13 ปริมาตร 250 มิลลิลิตร และให้อากาศอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 30 จะสังเกตเห็นว่าตัวอย่างน้ำมีสีเขียวเข้มมากขึ้น เมื่อตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์จะพบว่าภายในตัวอย่างแต่ละแหล่งน้ำนั้นจะประกอบด้วยสาหร่ายขนาดเล็กสายพันธุ์ชนิดต่างๆ อยู่รวมกันเป็นจำนวนมาก ดังแสดงในรูปที่ 1.3

รูปที่ 1.3 ตัวอย่างการเพิ่มจำนวนเซลล์สาหร่ายขนาดเล็กจากแหล่งน้ำที่เก็บจากแหล่งน้ำธรรมชาติ

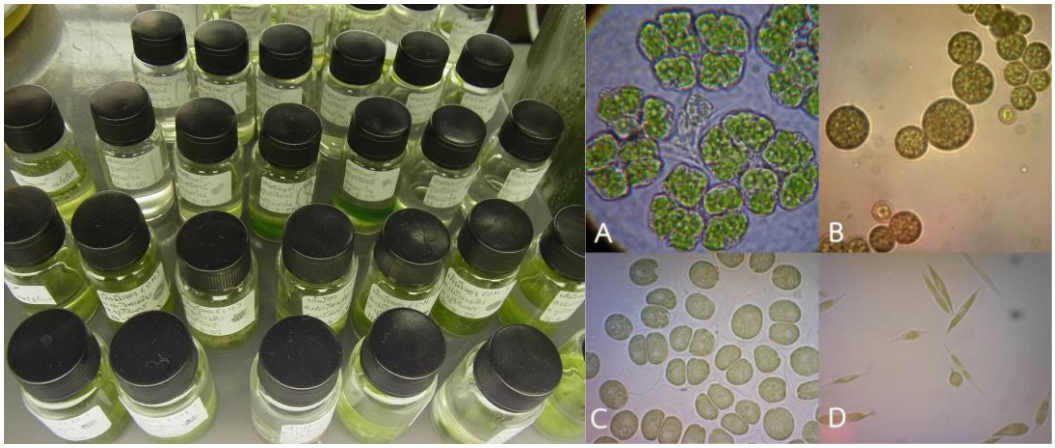
1.3 การคัดแยกสาหร่ายขนาดเล็ก

เมื่อเพิ่มปริมาณเซลล์สาหร่ายจากตัวอย่างแหล่งน้ำได้แล้วจึงนำมาคัดแยกสาหร่ายโดยใช้วิธีดูดออกด้วยไมโครปิเปตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Manipulative methods) ซึ่งเป็นวิธีการแยกสาหร่ายที่ต้องการโดยวิธีกล ของเหลวและเซลล์สาหร่ายขนาดเล็กจะไหลเข้าสู่ไมโครปิเปตเองโดยอาศัยแรงดึงแคปปิลลารี ดังแสดงในรูปที่ 1.4



รูปที่ 1.4 คัดแยกสาหร่ายจากแหล่งน้ำธรรมชาติโดยใช้วิธีดูดออกด้วยไมโครปิเปตภายใต้กล้องจุลทรรศน์

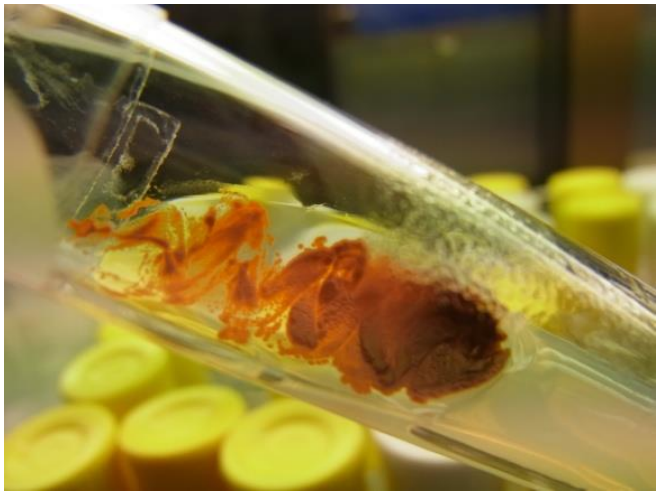
จากนั้นนำสาหร่ายที่แยกได้ไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์ โดยใช้ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงในขั้นตอนนี้ 60 – 120 วัน ในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบออโตโทรฟิค ที่มีอัตราการให้แสงต่อไม่ให้แสง 16 ต่อ 8 ชั่วโมง อุณหภูมิห้องเฉลี่ยประมาณ 28-29 องศาเซลเซียส ที่มีความเข้มแสงขนาดประมาณ 2,500 ลักซ์ การตรวจสอบว่าสาหร่ายเจริญขึ้นหรือไม่ โดยทำการสังเกตจากสีของอาหารเหลวซึ่งจะมีสีเขียว แล้วนำมาตรวจสอบว่าได้สายพันธุ์บริสุทธิ์หรือไม่ด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า ดังแสดงในรูปที่ 1.5



รูปที่ 1.5 ตัวอย่างสาหร่ายที่คัดแยกโดยวิธีดูดออกด้วยไมโครปิเปตและเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณเซลล์เป็นเวลา

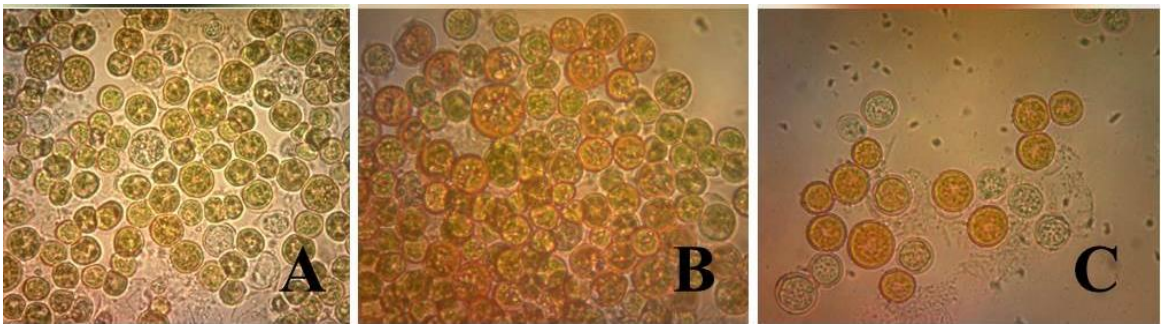
120 วัน (A: อ่างเก็บน้ำแม่เหียะ จ.เชียงใหม่ B: ป่าชายเลน สวนสมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ฯ จ. สมุทรสงคราม C: กรมการข้าว D: ลำวังหิน จ.นครราชสีมา)

สาหร่ายขนาดเล็กที่นำมาใช้ในการศึกษาในครั้งนี้เป็นสาหร่ายที่ได้จากการคัดแยกจากแหล่งน้ำในพื้นที่ป่าชายเลน สวนสมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ฯ จ. สมุทรสงคราม และในระหว่างขั้นตอนการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง เพื่อให้ได้สายพันธุ์ที่มีความบริสุทธิ์และทำเชื้อแม่พันธุ์เก็บไว้ (Stock culture) พบว่าสาหร่ายไอโซเลท SK-QSGMF6 มีลักษณะปรากฏของโคโลนีที่มีสีส้มแดงทั่วทั้งเซลล์ ดังแสดงในรูปที่ 1.6



รูปที่ 1.6 ลักษณะโคโลนีของสาหร่ายไอโซเลท SK-QSGMF6 ที่เจริญบนอาหารแข็ง

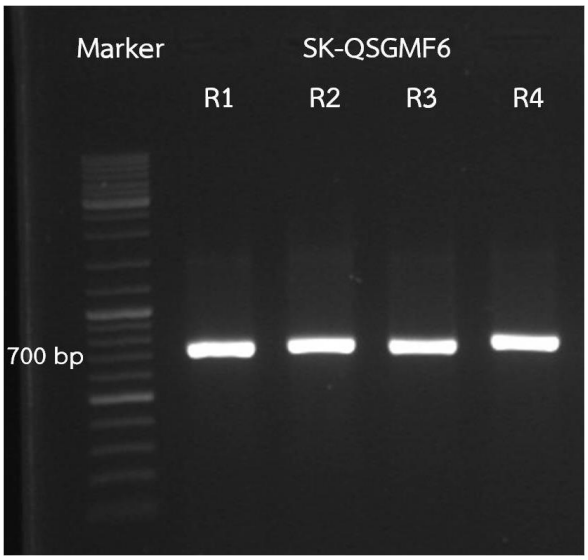
เมื่อทำการศึกษาลักษณะทางสรีระวิทยาของเซลล์พบว่า มีลักษณะเซลล์ในสภาพปกติเป็นรูปร่างกลม มีสีเขียวทั่วทั้งเซลล์ เมื่อเพาะเลี้ยงจนเจริญเข้าสู่ระยะ Stationary phase เซลล์เริ่มมีสีแดงภายในเซลล์ และเมื่อเพาะเลี้ยงจนเข้าสู่ระยะ Decline phase จะพบว่าเซลล์ยังคงมีสีแดงอยู่ทั่วเซลล์แต่มีเซลล์บางส่วนที่ตายไป (C) ดังแสดงในรูปที่ 1.7



รูปที่ 1.7 ลักษณะสรีระวิทยาของเซลล์สาหร่ายไอโซเลท SK-QSGMF6 ในสภาพปกติเป็นรูปร่างกลม มีสีเขียวทั่วทั้งเซลล์ (A) เมื่อเจริญเข้าสู่ระยะ stationary phase เซลล์เริ่มมีสีแดงภายในเซลล์ (B) และเมื่อเข้าสู่ระยะ Decline phase เซลล์มีสีแดงทั่วเซลล์และมีเซลล์บางส่วนที่ตาย (C)

1.4 การจัดจำแนกสายพันธุ์สาหร่าย

เมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายไอโซเลท SK-QSGMF6 ให้เจริญเข้าสู่ระยะ Log phase แล้วจึงนำเซลล์มาสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด Qiagen Kit และเพิ่มปริมาณ 18S rDNA โดยใช้เทคนิค polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ Universal eukaryotic primers จากผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและแยกชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกันออกจากกันด้วยสนามไฟฟ้า (Agarose gel electrophoresis) แล้วนำมาตรวจสอบขนาดและคุณภาพของผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอด้วยเครื่องถ่ายภาพและวิเคราะห์สารพันธุกรรม (Gel Documentation) พบว่ามีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอขนาดประมาณ 700 base pairs ดังแสดงในรูปที่ 1.8 และเมื่อนำไปเปรียบเทียบลำดับของนิวคลีโอไทด์ กับฐานข้อมูลใน GeneBank ด้วยโปรแกรม NCBI Blast พบว่าสาหร่ายไอโซเลท SK-QSGMF6 ที่คัดแยกได้มีลำดับเบสที่ใกล้เคียงกับ *Coelastrella* sp., Genbank Accession number JQ867368.1 โดยไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR มีลำดับเบสของ (ITS1 = TCCGTAGGTGAACCTGCGG) และ (ITS4 = TCCTCCGCTTATTGATATGC)



รูปที่ 1.8 แถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของสาหร่ายไอโซเลท SK-QSGMF6 ที่เพิ่มปริมาณ 18S rDNA ด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) และตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Gel Documentation

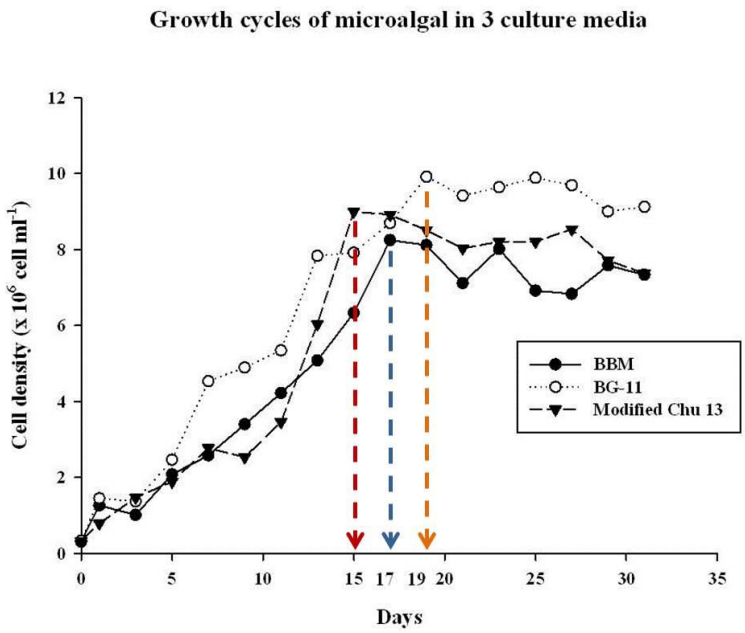
2. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตและการสะสมแคโรทีนอยด์ในเซลล์สาหร่ายขนาดเล็ก

เมื่อเตรียมหัวเชื้อสาหร่ายจากโคโลนีเดี่ยว (single colony) ของสาหร่ายไอโซเลท SK-QSGMF6 ได้แล้วนำมาเพาะเลี้ยงในระดับห้องปฏิบัติการโดยเพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ (Flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลวปริมาตร 150 มิลลิลิตร เพื่อคัดเลือกสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต ทั้งหมด 3 สูตร คืออาหารสูตร BBM, อาหารสูตร BG-11 และ อาหารสูตร Modified Chu-13 ทำการเพาะเลี้ยงสภาวะแบบออโตโทรฟิค ที่มีอัตราการให้แสงต่อไม่ให้แสง 16 ต่อ 8 ชั่วโมง ที่มีความเข้มแสงขนาดประมาณ 2,500 ลักซ์ อุณหภูมิห้องเฉลี่ยประมาณ 28-29 องศาเซลเซียส แล้วเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตของสาหร่ายในแต่ละกรรมวิธี ผลการทดลองพบว่าสาหร่ายสามารถเจริญเติบโตและผลิตเซลล์ได้ในปริมาณใกล้เคียงกันและมีรูปแบบของเซลล์เป็นสีเขียวเข้มในอาหารทั้ง 3 สูตรในรูปที่ 2.1

รูปที่ 2.1 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายไอโซเลท SK-QSGMF6 โดยใช้สูตรอาหาร BBM, BG-11 และ Modified Chu

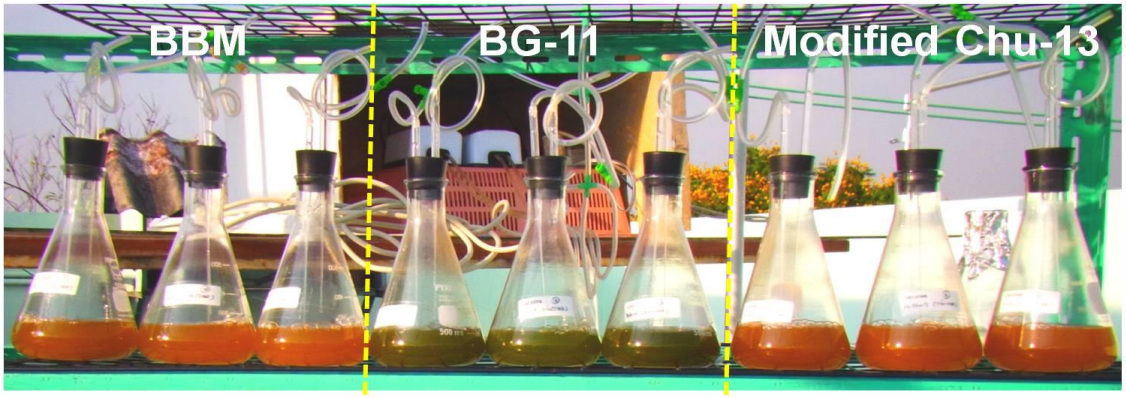
13 ภายใต้สภาวะออโตโทรฟิค ให้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ที่มีความเข้มแสงขนาดประมาณ 2,500 ลักซ์

เมื่อเปลี่ยนรูปแบบของการให้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนส์มาใช้แสงแดด ผลการทดลองพบว่า สาหร่ายไอโซเลท SK-QSGMF6 มีอัตราการเจริญเติบโตดังกราฟที่แสดงในรูปที่ 2.2 โดยพบว่า สาหร่ายสามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วและผลิตเซลล์ได้ในปริมาณสูงที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร BG 11 มีจำนวนเซลล์สูงที่สุด 9.92×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 19 วัน ได้ผลผลิตชีวมวล 3.2 กรัมต่อลิตร ส่วนอาหารสูตร Modified Chu 13 พบว่าสาหร่ายมีอัตราการเจริญเติบโตใกล้เคียงกับ BG-11 โดยมีจำนวนเซลล์สูงที่สุด 9.00×10^6 cells ml^{-1} เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 15 วัน ได้ผลผลิตชีวมวล 2.5 กรัมต่อลิตร ในขณะที่อาหารสูตร BBM สาหร่ายมีจำนวนเซลล์สูงที่สุด 8.25×10^6 cells ml^{-1} เมื่อเพาะเลี้ยงได้ 17 วัน ได้ผลผลิตชีวมวลเท่ากับ 1.87 กรัมต่อลิตร



รูปที่ 2.2 กราฟแสดงอัตราการเจริญเติบโตของสาหร่ายไอโซเลท SK-QSGMF6

อย่างไรก็ตามจากผลการทดลองนี้ยังพบว่า สาหร่ายไม่มีการสร้างสารสีส้มแดงไว้ภายในเซลล์เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร BG 11 แต่ในอาหารสูตร Modified Chu 13 และ BBM เซลล์มีการสะสมสารสีส้มแดงในปริมาณมากจนสามารถมองเห็นได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังแสดงในรูปที่ 2.3 ดังนั้นการทดลองในครั้งนี้จึงเลือกใช้อาหารสูตร Modified Chu 13 โดยใช้แสงแดดในการเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ และผลิตสารแคโรทีนอยด์ไว้ภายในเซลล์

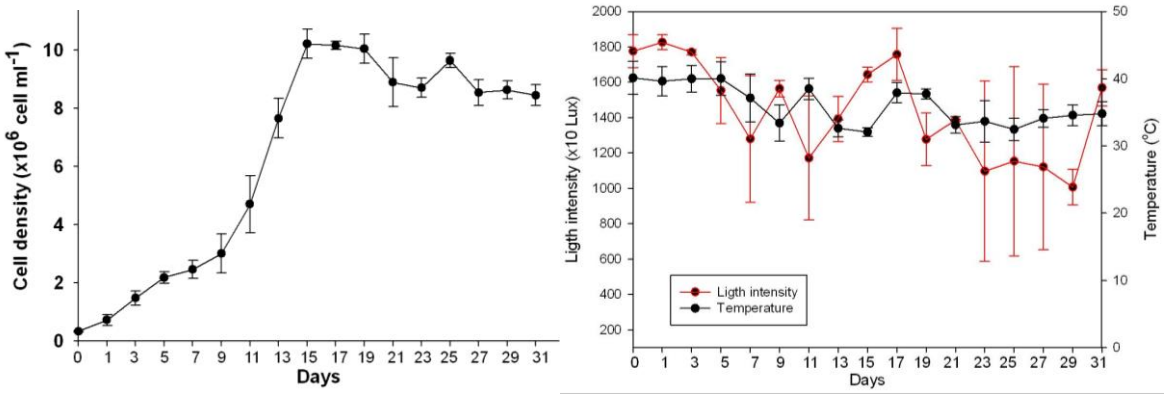


รูปที่ 2.3 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายไอโซเลท SK-QSGMF6 โดยใช้สูตรอาหาร BBM, BG-11 และ Modified Chu 13 ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงแบบออโตโทรฟิค โดยใช้แสงแดด

3. การเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กในระดับขยายขนาด

ในขั้นตอนนี้ได้ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายระบบเปิดนอกห้องปฏิบัติการโดยใช้อ่างไฟเบอร์กลาสที่มีปริมาตรรวมทั้งหมด 500 ลิตร แต่ให้มีปริมาตรในการทำงานวิจัย 200 ลิตร โดยมีใบพัดหมุนร่วมกับการให้อากาศจากปั๊มอากาศเพื่อใช้ในการหมุนเวียนน้ำเพื่อไม่ให้สาหร่ายตกตะกอน ผลการศึกษาการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในระดับขยายขนาดโดยใช้อาหารสูตร Modified Chu 13 ขนาด 200 ลิตร ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงแบบออโตโทรฟิคในระบบเปิดนอกห้องปฏิบัติการ โดยใช้แสงแดด ดังแสดงในรูปที่ 3.1 พบว่าสาหร่ายมีอัตราการเจริญเติบโตสูงที่สุดในสัปดาห์ที่ 2 ของการเพาะเลี้ยง สอดคล้องกับผลการทดลองในระดับฟลาสต์ในห้องปฏิบัติการ (มีจำนวนเซลล์สูงที่สุด 1.02×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 15 วัน ได้ผลผลิตชีวมวล 3.52 กรัมต่อลิตร) โดยตลอดระยะเวลาในการศึกษาในครั้งนี้มีระดับความเข้มของแสงอยู่ในช่วง 10-18 kLux และอุณหภูมิเฉลี่ยอยู่ในช่วง 32-40 องศาเซลเซียส ดังแสดงในรูปที่ 3.2

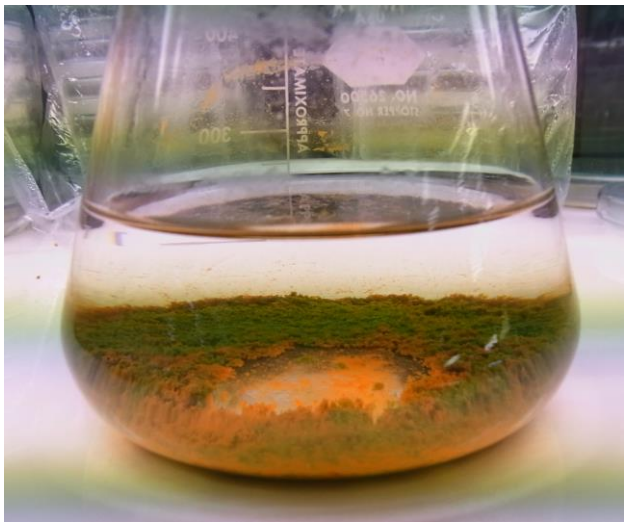
รูปที่ 3.1 (ซ้าย) ภาพแสดงการเพาะเลี้ยงในระดับขยายขนาดด้วยอาหารสูตร Modified Chu 13 โดยใช้แสงแดด (กลาง) ชีวมวลของสาหร่ายระยะ Log phase, (ขวา) ชีวมวลของสาหร่ายระยะ Stationary phase



รูปที่ 3.2 (ซ้าย) อัตราการเจริญเติบโตของสาหร่ายไอโซเลท SK-QSGMF6 ในอาหารสูตร Modified Chu 13 ขนาด 200 ลิตร ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงแบบออโตโทรฟิค โดยใช้แสงแดด (ขวา) ค่าเฉลี่ยของอุณหภูมิและความเข้มของแสงตลอดช่วงการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในระบบขยายขนาด

การศึกษาวิธีการเก็บเกี่ยวเซลล์สาหร่าย

ได้ทดลองใช้สารเคมีช่วยในการชักนำให้เกิดการตกตะกอนเปรียบเทียบกับการตกตะกอนของสาหร่ายไอโซเลท SK-QSGMF6 พบว่าในภาพรวมแล้วระยะเวลาในการตกตะกอนไม่แตกต่างกัน อาจเนื่องมาจากสาหร่าย มีเซลล์ขนาดใหญ่พอสมควร จึงทำให้สามารถตกตะกอนได้ดี ดังนั้นในการทดลองในครั้งนี้ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์สาหร่ายโดยวิธีการตกตะกอน ดังแสดงในรูปที่ 3.3



รูปที่ 3.3 แสดงการตกตะกอนของเซลล์สาหร่ายไอโซเลท SK-QSGMF6

4. การศึกษาวิธีการสกัดแคโรทีนอยด์ออกจากเซลล์สาหร่ายขนาดเล็ก

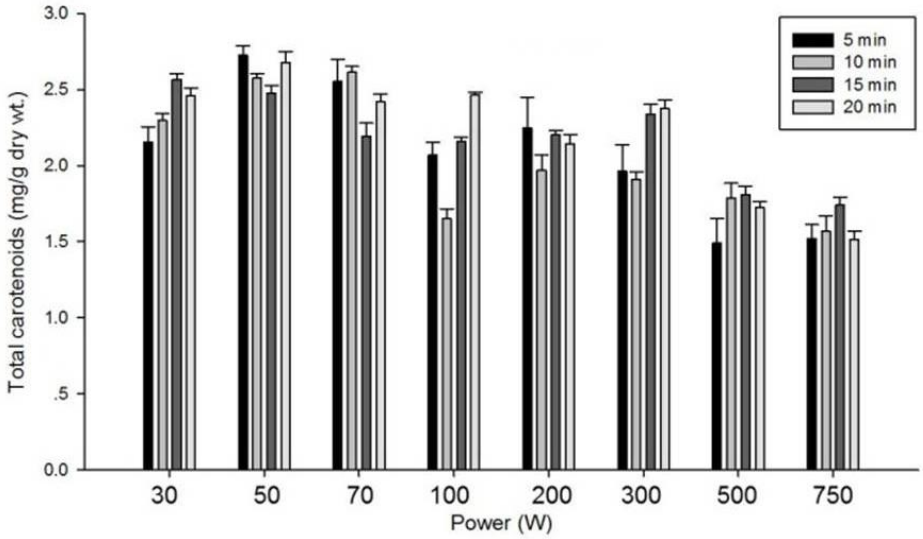
4.1 การศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้ไมโครเวฟมาใช้ในขั้นตอนการสกัด

ทำการเก็บเกี่ยวสาหร่ายเมื่อเพาะเลี้ยงจนเข้าสู่ระยะ Stationary phase แล้วนำมาทำให้เซลล์แตกด้วยสารละลาย Dimethyl Sulfoxide (DMSO) จากนั้นทำการศึกษาวิธีการสกัดแคโรทีนอยด์โดยการ

เปรียบเทียบระหว่างวิธีซอกเล็ท (Soxhlet extraction) และ การใช้คลื่นไมโครเวฟ (Microwave Assisted Extraction) โดยมีลักษณะและส่วนประกอบที่สำคัญของเครื่องดังแสดงในรูปที่ 4.1

รูปที่ 4.1 อุปกรณ์ต่างๆ ของชุดสกัดไมโครเวฟ (Microwave-assisted extraction unit) ที่ใช้ในการสกัดสารออกจากเซลล์สาหร่าย (A) Microwave digestion unit (B) Vessel unit (C) Sample extracted

ผลการทดลองพบว่าสภาวะในการสกัดสารออกจากเซลล์ที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุดคือ ใช้เวลาในการสกัด 5 นาที ที่กำลังไฟฟ้า 50 วัตต์ สามารถสกัดแคโรทีนอยด์ทั้งหมดได้ 2.72 มิลลิกรัมต่อกรัมของน้ำหนักแห้ง ในขณะที่วิธีซอกเล็ทใช้เวลาในการสกัด 60 นาที ได้ผลผลิตสารสกัดแคโรทีนอยด์ทั้งหมด 2.45 มิลลิกรัมต่อกรัมของน้ำหนักแห้ง ดังข้อมูลที่แสดงในรูปที่ 4.2 ซึ่งวิธีการสกัดโดยใช้ไมโครเวฟร่วมด้วยนั้นสามารถลดระยะเวลาได้มากกว่าการสกัดด้วยวิธีซอกเล็ท 12 เท่า และยังมีประสิทธิภาพในการสกัดแคโรทีนอยด์ออกจากเซลล์ได้สูงกว่าอีกด้วย ดังนั้นวิธีการสกัดสารแคโรทีนอยด์โดยใช้ไมโครเวฟร่วมนั้นน่าจะสามารถนำไปพัฒนาขั้นตอนการผลิตสารสำคัญ จากจากเซลล์สาหร่ายขนาดเล็กในระดับขยายขนาดในอนาคตได้



รูปที่ 4.2 การสกัดแคโรทีนอยด์ออกจากเซลล์สาหร่ายขนาดเล็กโดยใช้ไมโครเวฟโดยมีระยะเวลาในการสกัดเท่ากับ 5, 10, 15, 20 นาที และ กำลังไฟฟ้า 30, 50, 70, 100, 200, 300, 500 และ 750 วัตต์

4.2 องค์ประกอบภายในเซลล์สาหร่ายขนาดเล็ก

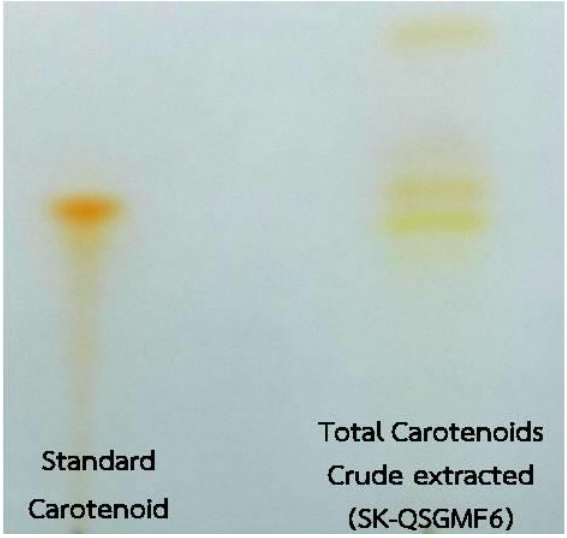
ชีวมวลของสาหร่ายที่ได้จากการเก็บเกี่ยวในระยะ Stationary phase ส่วนหนึ่งจะนำมาศึกษาองค์ประกอบอาหารต่างๆภายในเซลล์ของสาหร่าย ได้แก่ ความชื้น เถ้า ไขมัน โปรตีน และปริมาณเส้นใย ซึ่งมีผลการวิเคราะห์ดังแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 องค์ประกอบเบื้องต้นของเซลล์สาหร่ายที่ได้จากการเก็บเกี่ยวระยะ Stationary phase

องค์ประกอบเบื้องต้นของเซลล์สาหร่าย (% gDW)	
ความชื้น (Moisture)	4.79
เถ้า (Ash)	4.88
ไขมัน (Fat)	4.11
โปรตีน (Protein)	25.52
เส้นไย (Fiber)	4.52

4.3 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของแคโรทีนอยด์ที่กัดได้จากเซลลาหร่ายขนาดเล็ก

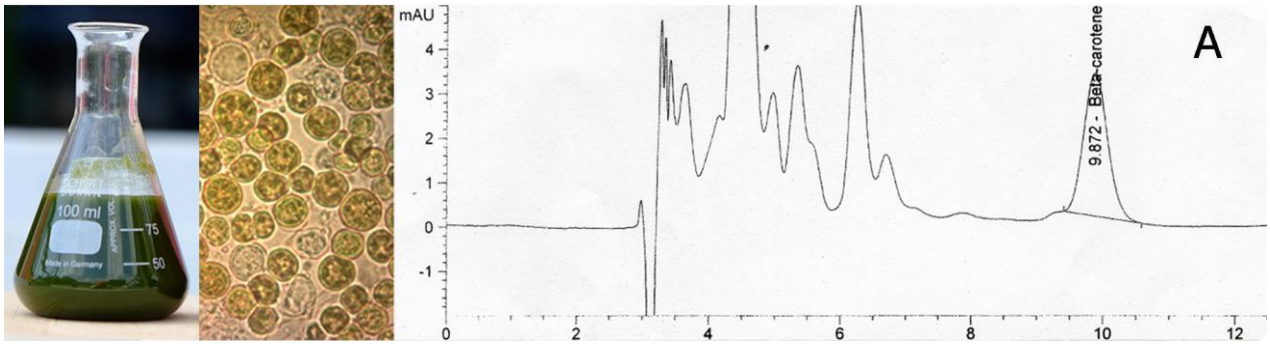
นำตัวอย่างสารสกัดแคโรทีนอยด์ที่สกัดได้โดยใช้ไมโครเวฟมาศึกษาลักษณะโครมาโตแกรมเบื้องต้นของแคโรทีนอยด์ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบแผ่นบาง (Thin Layer Chromatography: TLC เปรียบเทียบกับสารตัวอย่างมาตรฐาน พบว่าในเบื้องต้นโครมาโตแกรมมีค่าอัตราการเคลื่อนที่ของสารบนตัวดูดซับหรือ Retention Factor (Rf) value ในลักษณะใกล้เคียงกับสารมาตรฐาน ดังแสดงในรูปที่ 4.3

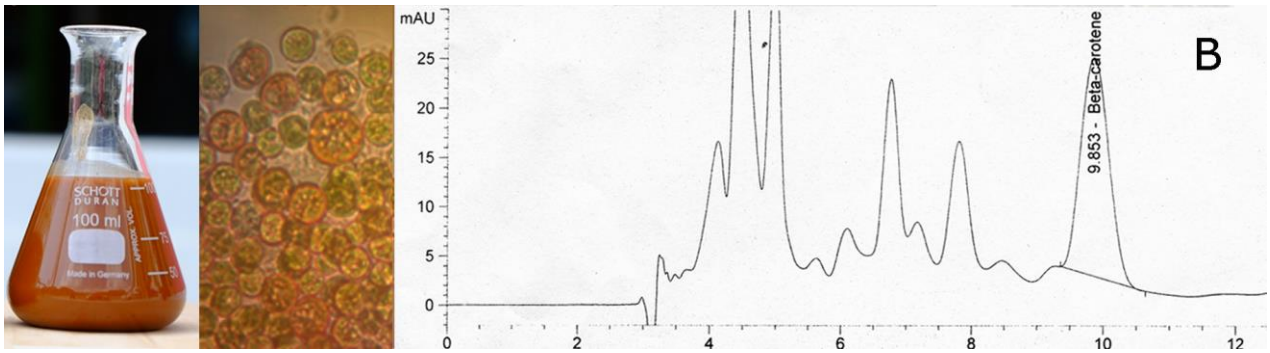


รูปที่ 4.3 โครมาโตแกรมของแคโรทีนอยด์ที่สกัดได้จากเซลล์แห้งของสาหร่าย **SK-QSGMF6**

จากนั้นนำตัวอย่างสารสกัดชุดเดียวกันนี้ไปตรวจวิเคราะห์อย่างละเอียดโดยใช้เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (Agilent HPLC System DAD Detector) คอลัมน์ที่ใช้วิเคราะห์คือ Partisil™ 5 ODS3 ตัวทำละลายเคลื่อนที่ (mobile phase) คือ acetonitrile:methanol:tetrahydrofuran, 40:55:5 (v/v/v) อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที เพื่อยืนยันชนิดของแคโรทีนอยด์ที่สกัดได้จากสาหร่ายไอโซเลท SK-QSGMF6

จากผลการวิเคราะห์ดังแสดงในรูปที่ 4.4 พบว่าสารสกัดจากสาหร่ายขนาดเล็กไอโซเลท SK-QSGMF6 มีเบต้าแคโรทีนเป็นแคโรทีนอยด์หลักภายในเซลล์ ซึ่งเมื่อนำสารสกัดจากสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงให้เจริญในระยะ log phase คือเซลล์ยังมีสีเขียวไปวิเคราะห์ พบว่ามีปริมาณเบต้าแคโรทีน 0.4 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ในขณะที่สารสกัดจากสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในระยะ Stationary phase หรือเซลล์มีสีส้มแดงนั้นจะมีปริมาณเบต้าแคโรทีน 1.3 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง แสดงให้เห็นว่าสภาวะที่เลือกใช้ในการทดลองในครั้งนี้ นั่นคือการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร Modified Chu 13 ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงแบบออโตโทรฟิค โดยใช้แสงแดดมีผลต่อการสร้างสารแคโรทีนอยด์ชนิดเบต้าแคโรทีนได้ซึ่งสูงกว่าในสภาพเซลล์ปกติถึง 3.25 เท่า





รูปที่ 4.4 โครมาโตแกรมของแคโรทีนอยด์ที่สกัดได้จากสาหร่าย **SK-QSGMF6**

(A) สาหร่ายในระยะ Log phase (B) สาหร่ายในระยะ Stationary phase

4.4 การวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชัน (antioxidant) ของสารสกัดแคโรทีนอยด์

เมื่อนำตัวอย่างสารสกัดแคโรทีนอยด์เดียวกันนี้ไปวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชัน (Antioxidant) โดยใช้วิธี DPPH assay เป็นวิธีการวิเคราะห์ที่ใช้ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl เป็น stable radical reagent ในตัวทำละลายเมทานอล เมื่อสารละลาย DPPH ทำปฏิกิริยากับสารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ สีของสารละลายเดิมมีสีม่วงจะค่อยๆเปลี่ยนเป็นสีเหลือง แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงยูวี ที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ เพื่อหาความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่าง เปรียบเทียบกับสารละลาย Trolox (6-hydroxy-2, 5, 7, 8- tetramethylchroman-2-carboxylic acid) ที่ใช้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน ผลการทดลองพบว่าสารสกัดเบต้าแคโรทีนจากเซลล์สาหร่ายขนาดเล็กไอโซเลท SK-QSGMF6 ในระยะ log phase มีค่าเปอร์เซ็นต์การออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระน้อยกว่า 5.00 miligram eq Trolox /100 g. ในขณะที่สารสกัดจากสาหร่ายในระยะ Stationary phase มีค่าเปอร์เซ็นต์การออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 10.62 miligram eq Trolox /100 g. จากข้อมูลดังกล่าวนี้ทำให้ทราบว่าการเพาะเลี้ยงสาหร่ายไอโซเลท SK-QSGMF6 แล้วได้เซลล์ที่มีสีส้มแดงของเบต้าแคโรทีนนั้นสามารถผลิตสารต้านอนุมูลอิสระได้ ซึ่งเป็นข้อมูลสำหรับนำไปพัฒนาต่อยอดผลิตเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพในเชิงพานิชย์ได้

9 **สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ**

สรุปผลการทดลอง

1. สาหร่ายขนาดเล็กที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้เป็นสาหร่ายที่ไอโซเลท SK-QSGMF6 ได้จากการคัดแยกได้จากแหล่งน้ำในพื้นที่ป่าชายเลน สวนสมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ฯ จ. สมุทรสงคราม มีรูปร่างกลมสีเขียวทั้งเซลล์ เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวจนเจริญเข้าสู่ระยะ stationary phase หรือเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งเซลล์หรือโคโลนีจะมีสีส้มแดงทั่วทั้งเซลล์ ผลจากการทำ Sequencing พบว่าเป็นสาหร่ายสายพันธุ์ *Coelastrella* sp.,
2. สภาวะที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตคือเพาะเลี้ยงด้วยอาหารสูตร Modified Chu 13 และเพาะเลี้ยงโดยใช้แสงแดดเพื่อผลิตสารแคโรทีนอยด์ไว้ภายในเซลล์ โดยพบว่าสาหร่ายมีอัตราการเจริญเติบโตใกล้เคียงกับ BG-11 มีจำนวนเซลล์สูงที่สุด 9.00×10^6 cells ml^{-1} เมื่อเพาะเลี้ยง 15 วัน ได้ผลผลิตชีวมวล 2.5 กรัมต่อลิตร
3. การเพาะเลี้ยงสาหร่ายระบบเปิดในระดับขยายขนาดโดยใช้อาหารสูตร Modified Chu 13 ขนาด 200 ลิตร ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงแบบออโตโทรฟิคในระบบเปิดนอกห้องปฏิบัติการ สาหร่ายมีจำนวนเซลล์สูงที่สุด 1.02×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 15 วัน ได้ผลผลิตชีวมวล 3.52 กรัมต่อลิตร) เนื่องจากสาหร่ายชนิดนี้มีเซลล์ขนาดใหญ่ ทำให้มีอัตราการตกตะกอนที่ดี ดังนั้นวิธีการเก็บเกี่ยวเซลล์ที่ง่ายและประหยัดที่สุดคือวิธีการตกตะกอนเซลล์
4. วิธีการสกัดแคโรทีนอยด์ออกจากเซลล์สาหร่ายโดยใช้ไมโครเวฟร่วมด้วยนั้นพบว่าสภาวะที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุดคือ ใช้เวลาในการสกัด 5 นาที ที่กำลังไฟฟ้า 50 วัตต์ สามารถสกัด แคโรทีนอยด์ทั้งหมดได้ 2.72 มิลลิกรัม ต่อกรัมของน้ำหนักแห้ง ในขณะที่วิธีซอกเล็ท ใช้เวลาในการสกัด 60 นาที ได้ผลผลิตสารสกัดแคโรทีนอยด์ทั้งหมด 2.45 มิลลิกรัมต่อกรัมของน้ำหนักแห้ง ซึ่งนั้นสามารถลดระยะเวลาได้มากกว่า 12 เท่า และยังมีประสิทธิภาพในการสกัดแคโรทีนอยด์ออกจากเซลล์ได้สูงกว่า
5. สารสกัดจากสาหร่าย *Coelastrella* sp. มีเบต้าแคโรทีนเป็นแคโรทีนอยด์หลักภายในเซลล์ ในปริมาณ 0.4 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง เมื่อสาหร่ายเจริญในระยะ log phase และ 1.3 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ในระยะ Stationary phase และมีค่าเปอร์เซ็นต์การออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 10.62 miligram eq Trolox /100 g.

ข้อเสนอแนะและการนำไปใช้ประโยชน์

โครงการวิจัยนี้ได้ทำการคัดแยกจากแหล่งน้ำธรรมชาติตามรายภาคของประเทศไทยจนได้สายพันธุ์บริสุทธิ์และได้เทคโนโลยีสำหรับการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กที่เพิ่มอัตราการผลิตชีวมวลสะสมสารสำคัญไว้ภายในเซลล์สาหร่ายได้สูง รวมทั้งวิธีการสกัดสารออกจากเซลล์ที่มีประสิทธิภาพในระดับหนึ่งแล้ว สามารถ

นำไปต่อยอดและพัฒนางานวิจัยในด้านการผลิตผลิตภัณฑ์จากสาหร่ายขนาดเล็ก ไม่ว่าจะเป็นการคัดเลือกกลุ่มสาหร่ายขนาดเล็กที่มีศักยภาพสูงเทียบเท่ากลุ่มพืชอาหารที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์แปรรูปที่มีมูลค่าสูง เช่น ผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพและเวชสำอาง บรรจุภัณฑ์ชีวภาพ ตลอดจนพลังงานชีวภาพ ช่วยลดการนำเข้าวัตถุดิบและเทคโนโลยีที่มีราคาสูงจากต่างประเทศได้ ซึ่งจำเป็นต้องมีเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมในแต่ละสภาพพื้นที่ ตลอดจนต้องมีการพัฒนาสายพันธุ์ให้มีการเจริญเติบโตที่ดี รวดเร็ว และมีการสะสมสารสำคัญชนิดต่างๆที่ต้องการต่อมวลเซลล์ในระดับที่สูงด้วย

10 การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

10.1 งานวิจัยในครั้งนี้ได้นำไปถ่ายทอดและแลกเปลี่ยนองค์ความรู้โดยการนำเสนอผลงานทางวิชาการในรูปแบบการบรรยายและโปสเตอร์ในงานประชุมวิชาการนานาชาติ ดังนี้

- Prayoon Enmak, Supamas Klinkajorn, Wimonwan Wattanawichit, Komate Satayawut, Supreeya Sukhasem and Surmsuk Salakpetch. Astaxanthin production from microalgae isolated from mangrove forest in Thailand, **15th International Biotechnology Symposium & Exhibition, Daegu Korea**, 16-21 Sep 2012. *(Oral presentation)*
- Prayoon Enmak, Wimonwan Wattanawichit, Supreeya Sukhasem, Teerachart Vichitcholchai, Screening and isolation of microalgae and factor influencing of pigment production, **The 5th International Conference on Algal Biomass, Biofuels and Bioproducts,** 7-10 June 2015, San Diego, USA. *(Poster presentation)*

10.2 งานวิจัยนี้สามารถใช้เป็นแนวทางในการนำไปต่อยอดและพัฒนางานวิจัยในด้านการผลิตผลิตภัณฑ์จากสาหร่ายขนาดเล็ก เพื่อประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์แปรรูปที่มีมูลค่าสูง เช่น ผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพและเวชสำอาง บรรจุภัณฑ์ชีวภาพ ตลอดจนพลังงานชีวภาพ ช่วยลดการนำเข้าวัตถุดิบและเทคโนโลยีที่มีราคาสูงจากต่างประเทศได้

11 เอกสารอ้างอิง

ยุวดี พีรพรพิศาล และฉมาภรณ์ นิวาศะบุตร. 2546. คู่มือปฏิบัติการสาหร่ายวิทยา. พิมพ์ครั้งที่ 5. เชียงใหม่. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ลัดดา วงศ์รัตน์. 2540. คู่มือการเลี้ยงแพลงตอนพืช. คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ลิ่วมโนมนต์ กาญจนภาชน์. 2527. **สาหร่าย.** คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 343 หน้า.

Donkin, P. 1976. Ketocarotenoid biosynthesis by Heamatococcus pluvialis. **Phytochemistry.** 15: 711-718.

Guerin M, Huntley ME, Olaizola M. (2003) *Haematococcus* astaxanthin: application for human health and nutrition. **Trends Biotechnol.** 21(5):210–216.

Miki, W., Biological functions and activities of animal carotenoids. **Pure and Appl. Chem.** 1991; 63: 141-6.

Rosenberg JN, Oyler GA, Wilkinson L, Betenbaugh MJ.(2008). A green light for engineered algae: redirecting metabolism to fuel a biotechnology revolution. **Curr Opin Biotechnol** 19(5):430-6.

Shan Qin , Guo-Xiang Liu, Zheng-Yu Hu, (2008). The accumulation and metabolism of astaxanthin in *Scenedesmus obliquus* (Chlorophyceae). **Process Biochemistry**, 43, 795–802

Sommer, T.R., D Souza, F.M.L. and Morrisy, N.m. (1992). Pigmentation of adult rainbow trout, Oncorhynchus mykiss , using the green alge *Haematococcus pluvialis* **Aquacult**. 106 :63-74